

## Minuman sari buah



© BSN 2014

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN  
Gd. Manggala Wanabakti  
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.  
Telp. +6221-5747043  
Fax. +6221-5747045  
Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)  
[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta



## Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup .....	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi .....	1
4 Komposisi .....	2
5 Klasifikasi.....	2
6 Syarat mutu.....	2
7 Pengambilan contoh .....	4
8 Cara uji .....	4
9 Syarat lulus uji.....	4
10 Higiene.....	4
11 Pengemasan.....	4
12 Syarat penandaan .....	4
Lampiran A (normatif) Cara uji minuman sari buah .....	5
Bibliografi .....	32



## Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Minuman sari buah* ini merupakan revisi dari SNI 01-3719-1995 Minuman sari buah. Standar ini dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut:

- Menyesuaikan standar dengan perkembangan teknologi terutama dalam metode uji dan persyaratan mutu;
- Menyesuaikan standar dengan peraturan-peraturan baru yang berlaku;
- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Mendukung perkembangan dan diversifikasi produk industri olahan buah.

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan ketentuan pada:

1. Undang-Undang Republik Indonesia No. 5 Tahun 1984 tentang Perindustrian.
2. Undang-Undang Republik Indonesia No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
3. Undang-Undang Republik Indonesia No. 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan.
4. Undang-Undang Republik Indonesia No. 18 Tahun 2012 tentang Pangan.
5. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu, dan Gizi Pangan.
7. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia No.24/M-IND/PER/2/2010 tentang Pencantuman Logo Tara Pangan dan Kode Daur Ulang pada Kemasan Pangan dari Plastik.
8. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 492/MENKES/PER/IV/2010, tentang Persyaratan Kualitas Air Minum.
9. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia Nomor 75/M-IND/7/2010 tentang Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik (*Good Manufacturing Practices*).
10. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 033/MENKES/PER/VII/2012, tentang Bahan Tambahan Pangan.
11. Surat Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori Pangan.
12. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK. 00.06.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemarkan Mikroba dan Kimia dalam Makanan.

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis 67-04-S1 Minuman yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 13 November 2012 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, Badan Pengawas Obat dan Makanan, dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 24 Mei 2013 sampai dengan 23 Juli 2013 dengan hasil akhir RASNI.



## Minuman sari buah

### 1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, syarat mutu, pengambilan contoh, dan cara uji minuman sari buah.

### 2 Acuan normatif

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

SNI ISO 4831:2012, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Metode horizontal untuk deteksi dan enumerasi koliform – Teknik Angka Paling Mungkin (APM)*.

SNI ISO 6887-1:2012, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Penyiapan contoh uji, suspensi awal dan pengenceran desimal untuk untuk pengujian mikrobiologi – Bagian 1 : aturan umum untuk penyiapan suspensi awal dan pengenceran desimal*

SNI ISO 6887-4, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Penyiapan contoh uji, suspensi awal dan pengenceran desimal untuk pengujian mikrobiologi – Bagian 4 : aturan khusus untuk penyiapan produk lain selain susu dan produk susu, daging dan produk daging, dan ikan serta produk perikanan*

SNI ISO 6888-1:2012, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Metoda horizontal untuk enumerasi staphylococci koagulasi-positif (Staphylococcus aureus dan spesies lain) – Bagian 1: Teknik menggunakan media Baird Parker Agar*

SNI ISO 7218:2012, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan- Persyaratan umum dan pedoman untuk pengujian mikrobiologi*

SNI ISO 7251:2012, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan- Metode horizontal untuk deteksi dan enumerasi Escherichia coli terduga – Teknik angka paling mungkin (APM)*

SNI ISO 21527-1, *Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Metode horizontal untuk enumerasi kapang dan khamir – Bagian 1: Teknik penghitungan koloni pada produk dengan aktivitas air lebih besar dari 0,95*.

### 3 Istilah dan definisi

#### 3.1

##### **minuman sari buah**

minuman yang diperoleh dengan mencampur air minum, sari buah atau campuran sari buah yang tidak difermentasi, dengan bagian lain dari satu jenis buah atau lebih, dengan atau tanpa penambahan gula, bahan pangan lainnya, bahan tambahan pangan yang diizinkan

#### 3.2

##### **air minum**

air yang melalui proses pengolahan atau tanpa proses pengolahan yang memenuhi syarat kesehatan dan dapat langsung diminum



## 4 Komposisi

### 4.1 Bahan baku

Sari buah dan air minum.

### 4.2 Bahan pangan lain

bahan pangan lain yang diizinkan untuk minuman sari buah.

### 4.3 Bahan tambahan pangan

bahan tambahan pangan yang diizinkan untuk minuman sari buah sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

## 5 Klasifikasi

Minuman sari buah mengandung total sari buah antara 35 % – 89 %.

## 6 Syarat mutu

Syarat mutu minuman sari buah sesuai Tabel 1.

**Tabel 1 – Syarat mutu minuman sari buah**

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Bau	-	khas, normal
1.2	Rasa	-	khas, normal
1.3	Warna	-	khas, normal
2	Padatan terlarut	°Brix	Sesuai Tabel 2
3	Keasaman	%	Sesuai Tabel 2
4	Cemaran logam		
4.1	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 0,2
4.2	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 0,2
4.3	Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40,0/ maks. 250*
4.4	Merkuri (Hg)	mg/kg	maks. 0,03
5	Cemaran arsen (As)	mg/kg	maks. 0,1
6	Cemaran mikroba		
6.1	Angka lempeng total	koloni/mL	maks. $1 \times 10^4$
6.2	Koliform	koloni/mL	maks. 20
6.3	<i>Escherichia coli</i>	APM/mL	< 3



Tabel 1 – Syarat mutu minuman sari buah (lanjutan)

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
6.4	<i>Salmonella</i> sp.	-	negatif/25 mL
6.5	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	negatif/mL
6.6	Kapang dan khamir	koloni/mL	maks.1 x 10 <sup>2</sup>
<b>CATATAN:</b> * untuk produk pangan yang dikemas dalam kaleng			

Tabel 2 - Padatan terlarut (°Brix) dan keasaman untuk Minuman Sari Buah

No	Jenis buah	Padatan terlarut (°Brix)	Keasaman* (%)
1	Anggur ( <i>Vitis vinifera</i> )	Min. 12,0	Min. 0,25
2	Apel ( <i>Pyrus malus</i> )	Min.10,5	Min. 0,30**
3	Asam ( <i>Tamarindus indica</i> )	Min. 13,0	Min. 0,3
4	Delima ( <i>Punica granatum</i> )	Min. 12,0	Min. 0,24
5	Jambu Biji Merah ( <i>Psidium guajava</i> var. Pink Guava)	Min. 8,5	Min. 0,2
6	Jeruk ( <i>Citrus sinensis</i> )	Min. 11,2	Min. 0,35
7	Leci ( <i>Litchi chinensis</i> )	Min. 10,0	Min. 0,15
8	Mangga ( <i>Mangifera indica</i> )	Min.11,0	Min. 0,20
9	Markisa ( <i>Pasiflora edulis</i> )	Min. 11,0	Min. 0,19
10	Melon ( <i>Cucumis melo</i> L.)	Min. 12,0	Min. 0,15
11	Nanas ( <i>Ananas comosus</i> )	Min. 10,0	Min.0,6
12	Sirsak ( <i>Annona muricata</i> L.)	Min. 12,0	Min. 0,45
13	Strawberi ( <i>Fragaria x. Ananassa</i> )	Min. 7,5	Min. 0,2
14	Mengkudu ( <i>Morinda citrifolia</i> )	Min. 16,0	Min. 0,9
<b>CATATAN</b> *) nilai keasaman berasal dari sari buah dan dapat ditambahkan asidulan **) sebagai asam malat ***) sebagai asam tartarat			



## **7 Pengambilan contoh**

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428.

## **8 Cara uji**

Cara uji untuk minuman sari buah seperti di bawah ini:

- a) Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1
- b) Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2
  - Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.1
  - Cara uji rasa sesuai Lampiran A.2.2
  - Cara uji warna sesuai Lampiran A.2.3
- c) Cara uji padatan terlarut sesuai lampiran A.3
- d) Cara uji keasaman sesuai Lampiran A.4
- e) Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran A.5
  - Cara uji timbal (Pb) dan kadmium (Cd) sesuai Lampiran A.5.1
  - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.5.2
  - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.5.3
- f) Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A.6
- g) Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran A.7
  - Persiapan dan homogenisasi contoh sesuai Lampiran A.7.1, SNI ISO 6887-1:2012 dan SNI ISO 6887-4:2012
  - Cara uji Angka Lempeng Total sesuai Lampiran A.7.2
  - Cara uji *E. coli* sesuai dengan SNI ISO 7251:2012
  - Cara uji *Salmonella* sp. sesuai Lampiran A.7.3
  - Cara uji Kapang & khamir sesuai dengan SNI ISO 21527-1:2012

## **9 Syarat lulus uji**

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Tabel 1 dan Tabel 2.

## **10 Higiene**

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

## **11 Pengemasan**

Produk dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

## **12 Syarat penandaan**

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.



**Lampiran A**  
(normatif)  
**Cara uji minuman sari buah**

**A.1 Persiapan contoh**

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik, dan uji kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan uji kimia.

**A.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi**

Buka kemasan contoh minuman sari buah dan ambil contoh secara aseptik sebanyak 400 mL, kemudian tempatkan dalam botol contoh steril.

**A.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik**

Buka kemasan contoh minuman sari buah dan ambil contoh secukupnya, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

**A.1.3 Persiapan contoh untuk uji kimia**

Buka kemasan contoh minuman sari buah dan ambil contoh sebanyak 400 mL, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

**A.2 Keadaan****A.2.1 Bau****A.2.1.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera penciuman yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

**A.2.1.2 Cara kerja**

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) cium contoh uji untuk mengetahui baunya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

**A.2.1.3 Cara menyatakan hasil**

- a) Jika tidak tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "khas, normal"; dan
- b) jika tercium bau asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

**A.2.2 Rasa****A.2.2.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera pengecap (lidah) yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.



#### A.2.2.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan rasakan dengan indera pengecap (lidah); dan
- b) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

#### A.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan “khas, normal”; dan
- b) jika terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan “tidak normal”.

#### A.2.3 Warna

##### A.2.3.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera penglihatan yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

##### A.2.3.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) amati warna contoh uji; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

##### A.2.3.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak terlihat warna asing, maka hasil dinyatakan “khas, normal”; dan
- b) jika terlihat warna asing, maka hasil dinyatakan “tidak normal”.

#### A.3 Padatan terlarut

##### A.3.1 Prinsip

Padatan terlarut diukur menggunakan refraktometer pada suhu 20 °C. Nilai indeks bias setara dengan jumlah padatan terlarut menggunakan tabel, atau langsung dibaca pada refraktometer yang mempunyai skala nilai padatan terlarut.

##### A.3.2 Peralatan

- a) Refraktometer;  
Dapat menggunakan salah satu dari alat berikut ini:
  - a.1 Refraktometer yang menunjukkan indeks bias dengan skala 0,001 agar mampu membaca hingga kira-kira 0,0002. Refraktometer ini diatur agar indeks bias pada suhu 20 °C untuk air suling menunjukkan nilai 1,3330
  - a.2 Refraktometer yang menunjukkan nilai sukrosa dengan skala 0,10 %. Refraktometer ini diatur agar nilai padatan terlarut (sukrosa) air suling menunjukkan nilai 0.
- b) Alat untuk sirkulasi air, alat ini berguna untuk mempertahankan suhu pada prisma refraktometer tetap stabil sekitar  $\pm 0,5$  °C agar nilai perbedaan suhu selain 20 °C dapat dihitung menggunakan tabel koreksi; dan
- c) Gelas piala 250 mL.



### A.3.3 Cara kerja

- Siapkan alat dengan teliti menurut buku panduan alat dan bersihkan permukaan prisma lalu keringkan;
- alirkan air pengontrol untuk mendapatkan suhu yang diharapkan (antara 15 °C sampai dengan 25 °C), biarkan air mengalir melalui mantel prisma refraktometer pada jangka waktu tertentu supaya terjadi keseimbangan suhu  $\pm 0,5$  °C (prisma dalam keadaan tertutup);
- pindahkan satu tetes air ke prisma refraktometer untuk menentukan titik nol atau digunakan sebagai koreksi;
- ambil larutan contoh dan atur suhu yang diinginkan. Teteskan (2 sampai dengan 3 tetes) larutan contoh ke dalam prisma refraktometer, buat larutan menyebar ke permukaan prisma dan segera atur tombol untuk mengatur prisma. Penggunaan lampu uap natrium akan mendapatkan hasil yang lebih tepat (khususnya untuk produk yang berwarna/gelap);
- baca refraktometer sesuai petunjuk buku panduan alat;
- gunakan beberapa skala koreksi untuk mendapatkan pembacaan terkoreksi.

**CATATAN** Apabila dikerjakan pada suhu selain 20 °C maka pembacaan harus dikoreksi dengan tabel koreksi pada Tabel A.2

### A.3.4 Perhitungan

- Refraktometer dengan skala indeks bias:  
Baca padatan terlarut dari Tabel A1, koreksi jika perlu
- Refraktometer dengan skala nilai sukrosa  
Hitung % padatan terlarut dari pembacaan langsung yang setara dengan hasil pembacaan pada A.6.4.a, koreksi jika perlu

### A.3.5 Penyajian hasil uji

Koreksi

Jika dibaca pada suhu selain dari 20 °C maka koreksinya adalah sebagai berikut:

- Untuk refraktometer yang menggunakan skala indeks bias menggunakan rumus:

$$n_D^{20} = n_D^t + 0,0013(t - 20)$$

**Keterangan:**

$n_D^{20}$  adalah indeks bias pada suhu 20 °C;

$n_D^t$  adalah indeks bias pada suhu pengukuran;

t adalah suhu dalam °C

- Untuk refraktometer yang menggunakan skala % sukrosa, koreksi hasil dengan menggunakan Tabel A.2

### A.3.6 Ketelitian

Perbedaan hasil antara dua penetapan tidak boleh lebih dari 5 % untuk produk yang mengandung padatan terlarut lebih besar 0,5 %



Tabel A.1. Hubungan antara indeks bias dan % padatan terlarut (sukrosa)

n	Padatan terlarut (sukrosa) % (massa)	n	Padatan terlarut (sukrosa) % (massa)	n	Padatan terlarut (sukrosa) % (massa)	n	Padatan terlarut (sukrosa) % (massa)
1,3400	4,823	1,3500	11,409	1,3600	17,677	1,3700	23,656
1,3401	4,891	1,3501	11,473	1,3601	17,738	1,3701	23,714
1,3402	4,958	1,3502	11,537	1,3602	17,799	1,3702	23,772
1,3403	5,026	1,3503	11,601	1,3603	17,860	1,3703	23,831
1,3404	5,093	1,3504	11,665	1,3604	17,922	1,3704	23,889
1,3405	5,161	1,3505	11,729	1,3605	17,993	1,3705	23,947
1,3406	5,228	1,3506	11,793	1,3606	18,044	1,3706	24,005
1,3407	5,295	1,3507	11,857	1,3607	18,105	1,3707	24,064
1,3408	5,363	1,3508	11,921	1,3608	18,166	1,3708	24,122
1,3409	5,430	1,3509	11,985	1,3609	18,227	1,3709	24,180
1,3410	5,497	1,3510	12,049	1,3610	18,288	1,3710	24,239
1,3411	5,564	1,3511	12,113	1,3611	18,348	1,3711	24,297
1,3412	5,631	1,3512	12,177	1,3612	18,409	1,3712	24,355
1,3413	5,698	1,3513	12,241	1,3613	18,470	1,3713	24,413
1,3414	5,786	1,3514	12,305	1,3614	18,531	1,3714	24,471
1,3415	5,033	1,3515	12,368	1,3615	18,592	1,3715	24,529
1,3416	5,900	1,3516	12,432	1,3616	18,652	1,3716	24,587
1,3417	5,967	1,3517	12,496	1,3617	18,713	1,3717	24,645
1,3418	6,033	1,3518	12,559	1,3618	18,774	1,3718	24,703
1,3419	6,100	1,3519	12,623	1,3619	18,834	1,3719	24,761
1,3420	6,157	1,3520	12,697	1,3620	18,895	1,3720	24,819
1,3421	6,234	1,3521	12,750	1,3621	18,956	1,3721	24,877
1,3422	6,301	1,3522	12,814	1,3622	19,016	1,3722	24,936
1,3423	6,368	1,3523	12,877	1,3623	19,077	1,3723	24,992
1,3424	6,434	1,3524	12,941	1,3624	19,137	1,3724	25,050
1,3425	6,501	1,3525	13,004	1,3625	19,198	1,3725	25,108
1,3426	6,569	1,3526	13,068	1,3626	19,258	1,3726	25,156
1,3427	6,634	1,3527	13,131	1,3627	19,319	1,3727	25,223
1,3428	6,701	1,3528	13,194	1,3628	19,379	1,3728	25,281
1,3429	6,767	1,3529	13,258	1,3629	19,440	1,3729	25,339
1,3430	6,834	1,3530	13,321	1,3630	19,500	1,3730	25,396
1,3431	6,900	1,3531	13,384	1,3631	19,560	1,3731	25,454
1,3432	6,967	1,3532	13,448	1,3632	19,621	1,3732	25,512
1,3433	7,033	1,3533	13,511	1,3633	19,681	1,3733	25,569
1,3434	7,100	1,3534	13,574	1,3634	19,741	1,3734	25,627
1,3435	7,165	1,3535	13,637	1,3635	19,801	1,3735	25,694
1,3436	7,232	1,3536	13,700	1,3636	19,851	1,3736	25,742
1,3437	7,299	1,3537	13,763	1,3637	19,922	1,3737	25,799
1,3438	7,365	1,3538	13,826	1,3638	19,982	1,3738	25,857
1,3439	7,431	1,3539	13,689	1,3639	20,042	1,3739	25,914



Tabel A.1 – Lanjutan

n	Padatan terlarut (sukrosa) % (massa)	n	Padatan terlarut (sukrosa) % (massa)	n	Padatan terlarut (sukrosa) % (massa)	n	Padatan terlarut (sukrosa) % (massa)
1,3440	7,497	1,3540	13,952	1,3640	20,102	1,3740	25,971
1,3441	7,563	1,3541	14,015	1,3641	20,182	1,3741	26,029
1,3442	7,630	1,3542	14,078	1,3642	20,222	1,3742	26,065
1,3443	7,686	1,3543	14,141	1,3643	20,282	1,3743	26,143
1,3444	7,762	1,3544	14,204	1,3644	20,342	1,3744	26,201
1,3445	7,828	1,3545	14,267	1,3645	20,402	1,3745	26,258
1,3446	7,894	1,3546	14,330	1,3646	20,462	1,3746	26,315
1,3447	7,960	1,3547	14,392	1,3647	20,522	1,3747	26,372
1,3448	8,025	1,3548	14,455	1,3648	20,581	1,3748	26,430
1,3449	8,092	1,3549	14,518	1,3649	20,641	1,3749	26,487
1,3450	8,157	1,3550	14,581	1,3650	20,701	1,3750	26,544
1,3451	8,223	1,3551	14,643	1,3651	20,761	1,3751	26,604
1,3452	8,289	1,3552	14,706	1,3652	20,820	1,3752	26,658
1,3453	8,356	1,3553	14,769	1,3653	20,880	1,3753	26,715
1,3454	8,420	1,3554	14,831	1,3654	20,940	1,3754	26,772
1,3455	8,486	1,3555	14,834	1,3655	21,000	1,3755	26,829
1,3456	8,552	1,3556	14,956	1,3656	21,059	1,3756	26,838
1,3457	8,617	1,3557	15,019	1,3657	21,119	1,3757	26,943
1,3458	8,683	1,3558	15,091	1,3658	21,178	1,3758	27,000
1,3459	8,749	1,3559	15,143	1,3659	21,238	1,3759	27,057
1,3460	8,814	1,3560	15,206	1,3660	21,297	1,3760	27,114
1,3461	8,880	1,3561	15,268	1,3661	21,357	1,3761	27,171
1,3462	8,945	1,3562	15,331	1,3662	21,416	1,3762	27,228
1,3463	9,010	1,3563	15,393	1,3663	21,476	1,3763	27,284
1,3464	9,076	1,3564	15,455	1,3664	21,535	1,3764	27,341
1,3465	9,141	1,3565	15,517	1,3665	21,595	1,3765	27,398
1,3466	9,207	1,3566	15,580	1,3666	21,654	1,3766	27,455
1,3467	9,272	1,3567	15,642	1,3667	21,713	1,3767	27,511
1,3468	9,337	1,3568	15,704	1,3668	21,772	1,3768	27,568
1,3469	9,402	1,3569	15,766	1,3669	21,832	1,3769	27,625
1,3470	9,468	1,3570	15,628	1,3670	21,891	1,3770	27,681
1,3471	9,533	1,3571	15,890	1,3671	21,950	1,3771	27,738
1,3472	9,598	1,3572	15,952	1,3672	22,009	1,3772	27,794
1,3473	9,663	1,3573	16,014	1,3673	22,063	1,3773	27,851
1,3474	9,728	1,3574	16,076	1,3674	22,128	1,3774	27,907
1,3475	9,793	1,3575	16,138	1,3675	22,187	1,3775	27,964
1,3476	9,858	1,3576	16,200	1,3676	22,246	1,3776	28,020
1,3477	9,923	1,3577	16,262	1,3677	22,305	1,3777	28,077
1,3478	9,989	1,3578	16,324	1,3678	22,364	1,3778	28,133
1,3479	10,053	1,3579	16,386	1,3679	22,423	1,3779	28,190
1,3480	10,118	1,3580	16,447	1,3680	22,462	1,378	28,246
1,3481	10,183	1,3581	16,509	1,3681	22,541	1,378	28,302
1,3482	10,247	1,3582	16,571	1,3682	22,600	1,378	28,359
1,3483	10,312	1,3583	16,633	1,3683	22,659	1,378	28,415



Tabel A.1 – Lanjutan

n	Padatan terlarut (sukrosa) % (massa)	n	Padatan terlarut (sukrosa) % (massa)	n	Padatan terlarut (sukrosa) % (massa)	n	Padatan terlarut (sukrosa) % (massa)
1,3484	10,377	1,3584	16,694	1,3684	22,716	1,378	28,471
1,3485	10,442	1,3585	16,755	1,3685	22,776	1,378	28,528
1,3486	10,506	1,3586	16,817	1,3686	22,835	1,378	28,584
1,3487	10,571	1,3587	16,879	1,3687	22,894	1,378	28,640
1,3488	10,636	1,3588	16,941	1,3688	22,953	1,378	28,698
1,3489	10,700	1,3589	17,002	1,3689	23,011	1,378	28,752
1,3490	10,765	1,3590	17,064	1,3690	23,070	1,3790	28,809
1,3491	10,829	1,3591	17,125	1,3691	23,129	1,3791	28,865
1,3492	10,894	1,3592	17,167	1,3692	23,187	1,3792	28,921
1,3493	10,958	1,3593	17,248	1,3693	23,246	1,3793	28,977
1,3494	11,023	1,3594	17,309	1,3694	23,305	1,3794	29,033
1,3495	11,087	1,3595	17,371	1,3695	23,363	1,3795	29,089
1,3496	11,151	1,3596	17,432	1,3696	23,422	1,3796	29,145
1,3497	11,216	1,3597	17,490	1,3697	23,480	1,3797	29,201
1,3498	11,280	1,3598	17,655	1,3698	23,539	1,3798	29,257
1,3499	11,344	1,3599	17,616	1,3699	23,597	1,3799	29,313

Tabel A.2. Koreksi Pembacaan Refraktometer dengan Skala Indikasi Sukrosa untuk Suhu Selain 20 °C

Sukrosa, g/100g										
Suhu	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
Dikurangi dari konsentrasi sukrosa										
17.0	0.18	0.19	0.20	0.20	0.21	0.21	0.22	0.22	0.23	0.23
18.0	0.12	0.13	0.13	0.14	0.14	0.14	0.15	0.15	0.15	0.16
19.0	0.06	0.06	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.08	0.08	0.08
Ditambahkan terhadap konsentrasi sukrosa										
21.0	0.06	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.06	0.08	0.08	0.08
22.0	0.13	0.14	0.14	0.14	0.15	0.15	0.15	0.15	0.16	0.16
23.0	0.20	0.21	0.21	0.22	0.22	0.23	0.23	0.23	0.23	0.24
24.0	0.27	0.28	0.29	0.29	0.30	0.30	0.31	0.31	0.31	0.32
25.0	0.34	0.35	0.36	0.37	0.38	0.38	0.39	0.39	0.40	0.40
26.0	0.42	0.43	0.44	0.46	0.46	0.46	0.47	0.47	0.49	0.48
27.0	0.50	0.51	0.52	0.53	0.54	0.55	0.55	0.56	0.56	0.56
28.0	0.58	0.59	0.60	0.61	0.62	0.63	0.64	0.64	0.64	0.65
29.0	0.66	0.67	0.68	0.69	0.70	0.71	0.72	0.73	0.73	0.73
30.0	0.74	0.75	0.77	0.78	0.79	0.80	0.81	0.81	0.81	0.82
31.0	0.83	0.84	0.85	0.87	0.88	0.89	0.89	0.90	0.90	0.90
32.0	0.91	0.93	0.94	0.95	0.96	0.97	0.98	0.99	0.99	0.99



### A.3 Keasaman

#### A.3.1 Prinsip

Keasaman dapat dihitung sebagai g asam/100 mL produk menggunakan faktor konversi sesuai jenis asam sebagai berikut:

- 0,067 untuk asam malat
- 0,045 untuk asam oksalat
- 0,070 untuk asam sitrat monohidrat
- 0,075 untuk asam tartarat
- 0,049 untuk asam sulfurat
- 0,060 untuk asam asetat
- 0,090 untuk asam laktat.

#### A.3.2 Peralatan

- a) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- b) Pipet ukur 5 mL dengan ketelitian 0,1 mL, terkalibrasi;
- c) Buret 25 mL dengan ketelitian 0,1 mL, terkalibrasi;
- d) Gelas ukur 250 mL, terkalibrasi;
- e) Gelas piala 250 mL, terkalibrasi; dan
- f) Gelas piala 25 mL

#### A.3.3 Pereaksi

- a) Akuades;
- b) NaOH.

#### A.3.4 Cara Kerja

##### A.3.4.1 Larutan tidak berwarna atau berwarna pucat

- a) Timbang 10 g minuman sari buah, larutkan dengan air mendidih hingga 250 mL;
- b) Titrasi dengan 0,1 M NaOH, gunakan 0,3 mL phenolptalein untuk setiap 100 mL larutan yang akan dititrasi sehingga terbentuk warna merah muda yang konstan hingga 30 detik

##### A.3.4.2 Larutan berwarna

- a) Timbang 10 g minuman sari buah, larutkan dengan akuades hingga 250 mL;
- b) Titrasi dengan 0,1 M NaOH hingga hampir mencapai titik akhir titrasi, gunakan 0,3 mL phenolptalein untuk setiap 100 mL larutan yang akan dititrasi;
- c) Pindahkan 2 sampai dengan 3 mL larutan ke dalam 20 mL aquades dalam gelas piala kecil (pada pengenceran ini warna larutan akan menjadi sangat pucat sehingga warna phenolptalein lebih mudah terlihat);
- d) Bila hasil pengenceran menunjukkan bahwa titik akhir titrasi belum tercapai, tuangkan hasil uji tersebut ke dalam larutan awal, teruskan titrasi hingga mencapai titik akhir titrasi. Dengan membandingkan pengenceran dalam gelas piala kecil, perbedaan yang terbentuk dengan penambahan beberapa tetes 0,1 M alkali akan lebih mudah diamati.

#### A.3.5 Perhitungan

$$\text{Keasaman (\%)} = \frac{V \times P \times N \times 100\%}{w}$$



Keterangan:

V adalah volume 0,1 M NaOH (mL)

P adalah faktor konversi

N adalah molaritas NaOH

w adalah berat contoh (g)

#### A.4 Cemarkan logam

##### A.4.1 Kadmium (Cd) dan timbal (Pb)

###### A.4.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada 450 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimal 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb.

###### A.4.1.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) terkalibrasi (sebaiknya menggunakan SSA tungku grafit);
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Penangas air;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- Gelas ukur 10 mL;
- Gelas piala 250 mL;
- Botol polipropilen;
- Cawan porselen/platina/kuarsa 50 mL sampai dengan 100 mL; dan
- Kertas saring tidak berabu dengan spesifikasi retensi partikel 20 µm sampai dengan 25 µm.

###### A.4.1.3 Pereaksi

- Asam nitrat, HNO<sub>3</sub> pekat;
- Asam klorida, HCl pekat;
- Larutan asam nitrat, HNO<sub>3</sub> 0,1 N;  
encerkan 7 mL HNO<sub>3</sub> pekat dengan aquabides dalam labu ukur 1 000 mL sampai tanda garis.
- Larutan asam klorida, HCl 6 N;  
encerkan 500 mL HCl pekat dengan aquabides dalam labu ukur 1 000 mL sampai tanda garis.
- Larutan baku 1 000 µg/mL Cd;  
larutkan 1,000 g Cd dengan 7 mL HNO<sub>3</sub> pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis, atau bisa digunakan larutan baku Cd 1 000 µg/mL siap pakai.
- Larutan baku 200 µg/mL Cd;  
pipet 10 mL larutan baku 1 000 µg/mL Cd ke dalam labu ukur 50 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 µg/mL Cd.



- g) Larutan baku 20  $\mu\text{g/mL}$  Cd;  
pipet 10 mL larutan baku 200  $\mu\text{g/mL}$  Cd ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20  $\mu\text{g/mL}$  Cd.
- h) Larutan baku kerja Cd;  
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,5 mL, 1 mL; 2 mL; 4 mL; 7 mL dan 9 mL larutan baku 20  $\mu\text{g/mL}$  kemudian tambahkan 5 mL larutan  $\text{HNO}_3$  1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,1  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,2  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,4  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,8  $\mu\text{g/mL}$ ; 1,4  $\mu\text{g/mL}$  dan 1,8  $\mu\text{g/mL}$  Cd.
- i) Larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Pb;  
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 mL  $\text{HNO}_3$  pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan aquabides sampai tanda garis, atau bisa digunakan larutan baku Pb 1 000  $\mu\text{g/mL}$  siap pakai.
- j) Larutan baku 50  $\mu\text{g/mL}$  Pb; dan  
pipet 5,0 mL larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Pb ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50  $\mu\text{g/mL}$ .
- k) Larutan baku kerja Pb;  
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,2 mL; 0,5 mL; 1 mL; 2 mL; 3 mL dan 4 mL larutan baku 50  $\mu\text{g/mL}$  kemudian tambahkan 5 mL larutan  $\text{HNO}_3$  1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan aquabides sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,1  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,25  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ; 1,0  $\mu\text{g/mL}$ ; 1,5  $\mu\text{g/mL}$  dan 2,0  $\mu\text{g/mL}$  Pb.

#### A.4.1.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh uji (W) dengan teliti dalam cawan porselen/platina/kuarsa;
- b) tempatkan cawan berisi contoh di atas pemanas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh tidak berasap lagi;
- c) lanjutkan pengabuan dalam tanur ( $450 \pm 5$ )  $^{\circ}\text{C}$  sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- d) apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes  $\text{HNO}_3$  pekat kira-kira 0,5 mL sampai dengan 3 mL;
- e) keringkan cawan di atas pemanas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu ( $450 \pm 5$ )  $^{\circ}\text{C}$  kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan  $\text{HNO}_3$  pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- f) larutkan abu berwarna putih dalam 5 mL HCl 6 N, kemudian larutkan dengan 10 mL  $\text{HNO}_3$  0,1 N dan masukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan aquabides (V), jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring, ke dalam botol polipropilen;
- g) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- h) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283 nm untuk Pb;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan
- k) hitung kandungan logam dalam contoh.



#### A.4.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V$$

**Keterangan:**

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ( $\mu\text{g/mL}$ );

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);

W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

#### A.4.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan *Relative Standard Deviation* (RSD) maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan logam. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

### A.4.2 Timah (Sn)

#### A.4.2.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan  $\text{HNO}_3$  dan  $\text{HCl}$  kemudian tambahkan  $\text{KCl}$  untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi  $\text{N}_2\text{O-C}_2\text{H}_2$ .

#### A.4.2.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Penangas air;
- Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- Pipet ukur 10 mL dan 5 mL, berskala 0,1 mL, terkalibrasi;
- Erlenmeyer 250 mL;
- Gelas ukur 50 mL; dan
- Gelas piala 250 mL.

#### A.4.2.3 Pereaksi

- Larutan kalium klorida,  $\text{KCl}$  10 mg/mL K; larutkan 1 g  $\text{KCl}$  dengan air menjadi 100 mL.
- Asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  pekat;
- Asam klorida,  $\text{HCl}$  pekat;
- Larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Sn; dan larutkan 1,000 g Sn dengan 200 mL  $\text{HCl}$  pekat dalam labu ukur 1 000 mL, tambahkan 200 mL air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan baku kerja Sn. pipet 10 mL  $\text{HCl}$  pekat dan 1,0 mL larutan  $\text{KCl}$  ke dalam masing-masing labu ukur 100 mL. Tambahkan masing-masing 0 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL dan 2,5 mL larutan baku 1000  $\mu\text{g/mL}$  Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan



baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 5 µg/mL; 10 µg/mL; 15 µg/mL; 20 µg/mL dan 25 µg/mL Sn.

#### A.4.2.4 Cara kerja

- Timbang 10 g sampai dengan 20 g (W) dengan teliti ke dalam Erlenmeyer 250 mL, tambahkan 30 mL HNO<sub>3</sub> pekat dan biarkan 15 menit;
- panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 mL sampai dengan 6 mL atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- angkat Erlenmeyer dari pemanas listrik, tambahkan 25 mL HCl pekat, dan panaskan selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl<sub>2</sub> berhenti;
- tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 mL sampai dengan 15 mL;
- tambahkan 40 mL air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 mL, bilas Erlenmeyer tersebut dengan 10 mL air suling (V);
- tambahkan 1,0 mL KCl, dinginkan pada suhu ruang, tepatkan dengan air suling sampai tanda garis dan saring;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi N<sub>2</sub>O-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Sn dalam contoh;

#### A.4.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V$$

#### Keterangan:

- C adalah konsentrasi timah (Sn) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/mL)  
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL); dan  
 W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

#### A.4.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan *Relative Standard Deviation* (RSD) maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan timah (Sn). Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

### A.4.3 Merkuri (Hg)

#### A.4.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa merkuri dengan NaBH<sub>4</sub> atau SnCl<sub>2</sub> dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbans Hg yang dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) tanpa nyala pada panjang gelombang maksimal 253,7 nm.



#### A.4.3.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- Microwave digester*;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- Tabung destruksi;
- Labu destruksi 250 mL berdasar bulat;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas ukur 25 mL;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi; dan
- Gelas piala 500 mL.

#### A.4.3.3 Bahan dan Pereaksi

- Larutan asam sulfat,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  9 M;
- Larutan asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  7 M;
- Campuran asam nitrat : asam hidroksi perklorat ( $\text{HNO}_3 : \text{HClO}_4 = 1:1$ );
- Hidrogen peroksida,  $\text{H}_2\text{O}_2$  pekat;
- Larutan natrium molibdat,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2 %;
- Larutan pereduksi;  
campurkan 50 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dengan 300 mL air suling dalam gelas piala 500 mL dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g  $\text{SnCl}_2$ . Pindahkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan natrium borohidrida,  $\text{NaBH}_4$ ;  
larutkan 3 g serbuk  $\text{NaBH}_4$  dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 mL.
- Larutan pengencer;  
masukkan 300 mL sampai dengan 500 mL air suling ke dalam labu ukur 1 000 mL dan tambahkan 58 mL  $\text{HNO}_3$  kemudian tambahkan 67 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- Larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Hg;  
larutkan 0,1354 g  $\text{HgCl}_2$  dengan kira-kira 25 mL air suling dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan baku 1  $\mu\text{g/mL}$  Hg; dan  
pipet 1 mL larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  Hg ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis, kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1  $\mu\text{g/mL}$ .
- Larutan baku kerja Hg; dan  
pipet masing-masing 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL; dan 2 mL larutan baku 1  $\mu\text{g/mL}$  ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,0 025  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,005  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,01  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,02  $\mu\text{g/mL}$  Hg.
- Batu didih.



#### A.4.3.4 Cara kerja

##### A.4.3.4.1 Pengabuan basah

- Timbang 5 g contoh (W) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  9 M, 20 mL  $\text{HNO}_3$  7 M, 1 mL larutan natrium molibdat 2 %, dan 5 butir sampai dengan 6 butir batu didih;
- hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas pemanas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- tambahkan 20 mL campuran  $\text{HNO}_3$  :  $\text{HClO}_4$  (1:1) melalui pendingin;
- hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- tambahkan 10 mL air suling melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- didihkan lagi selama 10 menit;
- matikan pemanas listrik dan cuci pendingin dengan 15 mL air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu ruang;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- pipet 25 mL larutan di atas ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Hg dalam contoh.

##### A.4.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- Timbang 1 g contoh (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 10 mL  $\text{HNO}_3$ , 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  kemudian tutup rapat;
- masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Hg dalam contoh.



#### A.4.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan merkuri (Hg) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V \times fp$$

##### Keterangan:

- C adalah konsentrasi merkuri (Hg) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ( $\mu\text{g/mL}$ );  
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);  
 W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);  
 fp adalah faktor pengenceran.

#### A.4.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan *Relative Standard Deviation* (RSD) maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan merkuri (Hg). Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

### A.5 Cemarkan arsen (As)

#### A.5.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan  $\text{As}^{5+}$  direduksi dengan KI menjadi  $\text{As}^{3+}$  dan direaksikan dengan  $\text{NaBH}_4$  atau  $\text{SnCl}_2$  sehingga terbentuk  $\text{AsH}_3$  yang kemudian dibaca dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 193,7 nm.

#### A.5.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Microwave digester*;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Bunsen Burner*;
- Labu *Kjeldahl* 250 mL;
- Labu berbahan borosilikat berdasar bulat 50 mL;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas piala 200 mL;
- Pipet volumetrik 25 mL terkalibrasi;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- Cawan porselen 50 mL; dan
- Gelas ukur 25 mL.

#### A.5.3 Pereaksi

- Asam nitrat,  $\text{HNO}_3$  pekat;
- Asam sulfat,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat;
- Asam perklorat,  $\text{HClO}_4$  pekat;
- Ammonium oksalat,  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$  jenuh;
- Hidrogen peroksida,  $\text{H}_2\text{O}_2$  pekat;
- Larutan natrium borohidrida,  $\text{NaBH}_4$  4 %;  
 larutkan 3 g  $\text{NaBH}_4$  dan 3 g  $\text{NaOH}$  dengan air suling sampai tanda garis dalam labu ukur 500 mL.



- g) Larutan asam klorida, HCl 8 M;  
larutkan 66 mL HCl pekat kedalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- h) Larutan timah (II) klorida,  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10 %;  
timbang 50 g  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ke dalam gelas piala 200 mL dan tambahkan 100 mL HCl pekat. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- i) Larutan kalium iodida, KI 20 %;  
timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- j) Larutan  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  75 mg/mL;  
larutkan 3,75 g MgO dengan 30 mL  $\text{H}_2\text{O}$  secara hati-hati, tambahkan 10 mL  $\text{HNO}_3$ , dinginkan dan encerkan hingga 50 mL dengan air suling;
- k) Larutan baku 1 000  $\mu\text{g/mL}$  As;  
larutkan 1,3203 g  $\text{As}_2\text{O}_3$  kering dengan sedikit NaOH 20 % dan netralkan dengan HCl atau  $\text{HNO}_3$  1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- l) Larutan baku 100  $\mu\text{g/mL}$  As;  
pipet 10 mL larutan baku As 1 000  $\mu\text{g/mL}$  ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100  $\mu\text{g/mL}$  As.
- m) Larutan baku 1  $\mu\text{g/mL}$  As; dan  
pipet 1 mL larutan baku As 100  $\mu\text{g/mL}$  ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1  $\mu\text{g/mL}$  As.
- n) Larutan baku kerja As.  
pipet masing-masing 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL dan 5,0 mL larutan baku 1  $\mu\text{g/mL}$  As ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,02  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,03  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,04  $\mu\text{g/mL}$  dan 0,05  $\mu\text{g/mL}$  As.

#### A.5.4 Cara kerja

##### A.5.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (W) ke dalam labu *Kjeldahl* 250 mL, tambahkan 5 mL sampai dengan 10 mL  $\text{HNO}_3$  pekat dan 4 mL sampai dengan 8 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat dengan hati-hati;
- b) setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan  $\text{HNO}_3$  pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- c) tambahkan 2 mL  $\text{HClO}_4$  70 % sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan  $\text{HClO}_4$ , tambahkan lagi sedikit  $\text{HNO}_3$  pekat);
- d) dinginkan, tambahkan 15 mL  $\text{H}_2\text{O}$  dan 5 mL  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$  jenuh;
- e) panaskan sehingga timbul uap  $\text{SO}_3$  di leher labu;
- f) dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- g) pipet 25 mL larutan diatas dan tambahkan 2 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20 % kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) tambahkan larutan pereduksi ( $\text{NaBH}_4$ ) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- j) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;



- k) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- l) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- m) lakukan pengerjaan duplo; dan
- n) hitung kandungan As dalam contoh.

#### A.5.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (W) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL  $\text{HNO}_3$ , 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  kemudian tutup rapat.
- b) masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) pipet 10 mL larutan destruksi ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 mL, tambahkan 1 mL larutan  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ , Uapkan di atas pemanas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan suhu ( $450^\circ\text{C}$ ) ( $\pm 1$  jam);
- e) dinginkan, larutkan dengan 2,0 mL  $\text{HCl}$  8 M, 0.1 mL  $\text{KI}$  20 % dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- f) siapkan  $\text{NaBH}_4$  dan  $\text{HCl}$  dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- g) tuangkan larutan baku kerja As 0,01  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,02  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,03  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,04  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,05  $\mu\text{g/mL}$  serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan Bunsen burner serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- h) baca nilai absorbans tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- k) lakukan pengerjaan duplo; dan
- l) hitung kandungan As dalam contoh.

#### A.5.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (As) (mg/kg)} = \frac{C}{W} \times V \times fp$$

##### Keterangan:

- C adalah konsentrasi arsen (As) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per miliiliter ( $\mu\text{g/mL}$ );
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- fp adalah faktor pengenceran.

#### A.5.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan *Relative Standard Deviation* (RSD) maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan arsen (As). Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.



## A.6 Cemarkan mikroba

### A.6.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Angka Lempeng Total

#### A.6.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk mengaktifkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

#### A.6.1.2 Peralatan

- Alat homogenisasi (blender) dengan kecepatan putaran 10 000 rpm sampai dengan 12 000 rpm;
- Otoklaf;
- Neraca analitik kapasitas 2 000 g terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Pemanas listrik;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas piala steril;
- Erlenmeyer steril;
- Botol pengencer steril;
- Pipet volumetrik steril 10,0 mL dan 1,0 mL terkalibrasi, dilengkapi dengan *bulb* dan *pipettor*;
- Tabung reaksi; dan
- Sendok, gunting, dan spatula steril.

#### A.6.1.3 Larutan pengencer untuk Angka Lempeng Total

##### *Buffered peptone water (BPW)*

- Peptone	10 g
- Natrium klorida	5 g
- Dinatrium hidrogen fosfat	3,5 g
- Kalium dihidrogen fosfat	1,5 g
- Air suling	1 L

Larutkan bahan-bahan di atas menjadi 1 L dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan menggunakan otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

#### A.6.1.4 Homogenisasi contoh untuk ALT

- Pipet 25 mL contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 225 mL larutan pengencer steril sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

### A.6.2 Angka lempeng total

#### A.6.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 72 jam pada suhu  $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .



**A.6.2.2 Peralatan**

- a) Inkubator ( $30 \pm 1$ ) °C, terkalibrasi;
- b) Oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi;
- c) Otoklaf;
- d) Penangas air bersirkulasi ( $45 \pm 1$ ) °C;
- e) Alat penghitung koloni;
- f) Botol pengencer 160 mL terbuat dari gelas borosilikat, dengan sumbat karet atau tutup ulir plastik;
- g) Pipet ukur 1 mL steril dengan skala 0,1 mL dilengkapi *bulb* dan *pipettor*; dan
- h) Cawan Petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 90 mm), steril.

**A.6.2.3 Pembenihan dan pengencer**a) *Buffered peptone water* (BPW)

- |                             |       |
|-----------------------------|-------|
| – Peptone                   | 10 g  |
| – Natrium klorida           | 5 g   |
| – Dinatrium hidrogen fosfat | 3,5 g |
| – Kalium dihidrogen fosfat  | 1,5 g |
| – Air suling                | 1 L   |

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1 000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

b) *Plate count agar* (PCA)

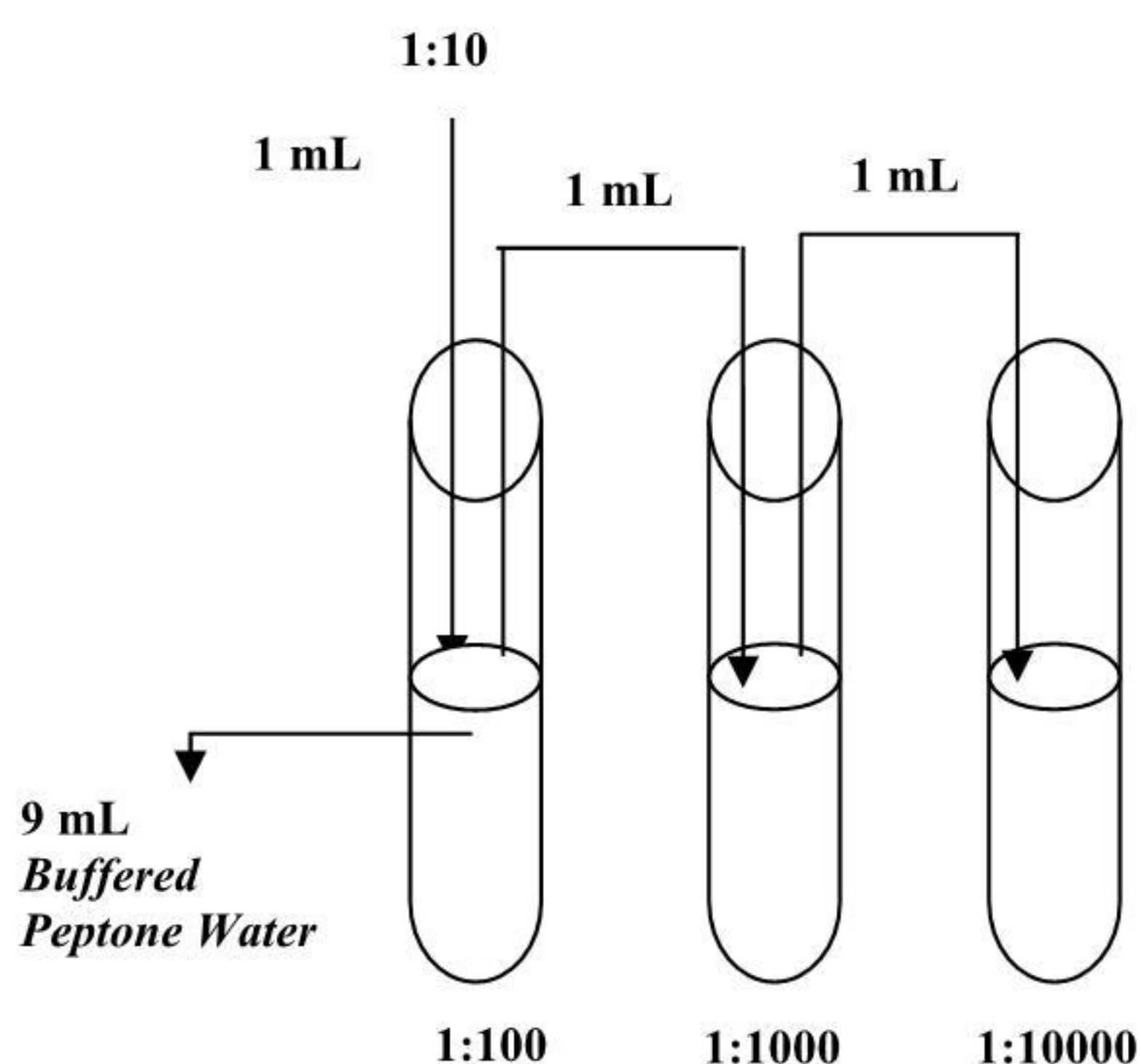
- |                                       |                       |
|---------------------------------------|-----------------------|
| – <i>Yeast extract</i>                | 2,5 g                 |
| – <i>Pancreatic digest of caseine</i> | 5 g                   |
| – Glukosa                             | 1 g                   |
| – Agar                                | 15 sampai dengan 20 g |
| – Air suling                          | 1 L                   |

Larutkan semua bahan-bahan, atur pH 7,0. Masukkan dalam labu, sterilkan pada 121 °C selama 15 menit.

**A.6.2.4 Cara kerja**

- a) Timbang 25 g contoh, masukkan ke dalam Erlenmeyer yang telah berisi 225 mL larutan pengencer hingga diperoleh pengenceran 1:10. Kocok campuran beberapa kali hingga homogen. Pengenceran dilakukan sampai tingkat pengenceran tertentu sesuai keperluan seperti pada Gambar A.1.





**Gambar A.1 - Tingkat pengenceran menggunakan larutan pengencer *Buffered Peptone Water* (BPW).**

- Pipet masing-masing 1 mL dari pengenceran  $10^1$  -  $10^5$  ke dalam cawan Petri steril secara duplo.
- Ke dalam setiap cawan Petri tuangkan sebanyak 12 mL sampai dengan 15 mL media PCA yang telah dicairkan yang bersuhu  $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$  dalam waktu 15 menit dari pengenceran pertama.
- Goyangkan cawan Petri dengan hati-hati (putar dan goyangkan ke depan dan ke belakang serta ke kanan dan ke kiri) hingga contoh tercampur rata dengan pembenihan.
- Kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer dengan pembenihan untuk setiap contoh yang diperiksa.
- Biarkan hingga campuran dalam cawan Petri membeku.
- Masukkan semua cawan Petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengering dan inkubasikan pada suhu  $30 ^\circ\text{C}$  selama 72 jam.
- Catat pertumbuhan koloni pada setiap cawan Petri yang mengandung (25 - 250) koloni setelah 72 jam.
- Hitung angka lempeng total dalam 1 mL contoh dengan mengalikan jumlah rata-rata koloni pada cawan Petri dengan faktor pengenceran yang digunakan.

#### A.6.2.5 Perhitungan

Angka lempeng total (koloni/mL) =  $n \times F$

##### Keterangan:

- $n$  adalah rata – rata koloni dari dua cawan Petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per mL (koloni/mL);  
 $F$  adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai

#### A.6.2.6 Pernyataan hasil

##### A.6.2.6.1 Cara menghitung

- Pilih cawan Petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan Petri. Hitung semua koloni dalam



- cawan Petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;
- b) jika salah satu dari dua cawan Petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$
120	25
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- c) jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus :

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

**Keterangan:**

- C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap cawan Petri;  
 $n_1$  adalah jumlah cawan Petri dari pengenceran pertama yang dihitung;  
 $n_2$  adalah jumlah cawan Petri dari pengenceran kedua;  
d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- d) jika jumlah koloni dari masing-masing cawan Petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;
- jika jumlah koloni per  $\text{cm}^2$  kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1\,000 \times 640 = 640\,000 (6.4 \times 10^5)$

- jika jumlah koloni per  $\text{cm}^2$  lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya:  
area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per  $\text{cm}^2$

Contoh :

$10^{-2}$	$10^{-3}$	area ( $\text{cm}^2$ )	jumlah bakteri perkiraan
~	7 150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6\,500\,000 (6.5 \times 10^6)$
~	6 490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5\,900\,000 (5.9 \times 10^6)$

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan Petri kurang dari 25, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah;



- f) menghitung koloni yang merambat.  
Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :
- perambatan berupa rantai yang tidak terpisah;
  - perambatan yang terjadi diantara dasar cawan Petri dan pembedahan; dan
  - perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan pembedahan.
- Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk lebih dari satu perambatan dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni; dan
- g) jika tidak ada koloni yang tumbuh pada cawan Petri, nyatakan hasil sebagai nol koloni per gram dikalikan dengan faktor pengenceran terendah ( $<10$ ).

#### A.6.2.6.2 Cara membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri):

- a) Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;  
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya  $5,3 \times 10^2$
- b) jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan  
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya  $5,2 \times 10^2$
- c) jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut:
  - bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan  
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya  $5,8 \times 10^2$
  - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap.  
contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya  $5,6 \times 10^2$

### A.6.3 *Salmonella* sp.

#### A.6.3.1 Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pra pengkayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media pengkayaan, dan kemudian dilanjutkan pada media selektif. Selanjutnya contoh dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media selektif kemudian diisolasi dan dilanjutkan dengan ditegaskan melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *Salmonella* sp.

#### A.6.3.2 Peralatan

- a) Inkubator ( $37 \pm 1$ ) °C;
- b) Otoklaf;
- c) Oven;
- d) Neraca, kapasitas 2000 g, dengan ketelitian 0,1 g;
- e) Neraca, kapasitas 120 g, dengan ketelitian 5 mg;
- f) Penangas air, (44 sampai dengan 47) °C;
- g) Penangas air, bersirkulasi, *thermostatically-controlled*, ( $41,5 \pm 1$ ) °C;
- h) Penangas air bersuhu ( $37 \pm 1$ ) °C;
- i) pH meter;
- j) Blender dan blender jar (botol) steril;
- k) Botol bertutup ulir bermulut lebar (500 mL) steril, *Erlenmeyer* 500 mL steril, *beaker*, 250 mL steril, *sterile glass* atau *paper funnels* dengan ukuran sesuai, dan, pilihan lain, kontainer dengan kapasitas sesuai untuk mengakomodasi contoh komposit;
- l) *Bent glass* atau batang penyebar plastik steril;
- m) Sendok steril, atau peralatan lain untuk memindahkan contoh makanan;
- n) Cawan petri steril, 15 x 100 mm, kaca atau plastik;



- o) Pipet steril, 1 mL dengan ketelitian 0,01 mL; dan pipet steril 5 mL dan 10 mL dengan skala 0,1 mL;
- p) Jarum Ose (diameter  $\pm 3$  mm), terbuat dari *nichrome*, *platinum-iridium chromel wire* atau plastik steril;
- q) Jarum Ose yang berujung runcing;
- r) Tabung reaksi atau tabung biakan steril, 16 x 150 mm dan 20 x 150 mm; tabung serologikal, 10 x 75 mm atau 13 x 100 mm;
- s) Botol pengencer 500 mL;
- t) Rak tabung reaksi atau rak tabung biakan;
- u) *Vortex mixer*;
- v) Lampu (untuk mengamati reaksi serologi);
- w) *Fisher* atau *Bunsen burner*;
- x) Kertas pH (kisaran pH 6 sampai dengan 8) dengan ketelitian maksimal 0,4 unit pH per perubahan warna; dan
- y) Gunting, gunting besar, pisau bedah, dan *forceps* steril.

#### A.6.3.3 Perbenihan dan pereaksi

- a) *Buffered peptone water* (BPW);
- b) Media *Rappaport-Vassiliadis* (RVS) (media RVS harus dibuat dari bahan-bahan yang terdapat dalam komposisi media RV tersebut). Formulasi yang tersedia secara komersial tidak dapat diterima);
- c) *Muller – Kauffmann Tetrathionate / novobiocin* (MKTTn) *broth*;
- d) *Xylose lysine desoxycholate* (XLD) agar;
- e) *Hektoen enteric* (HE) agar;
- f) *Bismuth sulfite* (BS) agar;
- g) *Triple sugar iron* (TSI) agar;
- h) Urea agar;
- i) *Lysine decarboxylase broth* (LDB);
- j) Larutan *physiological saline*, 0,85% (steril);
- k) Toluene;
- l) Pereaksi uji  $\beta$ -galaktosidase (atau kertas cakram siap pakai yang penggunaannya sesuai instruksi pabrik);
- m) Media *Voges-Proskauer* (VP);
- n) Pereaksi uji *Voges-Proskauer* (VP);
- o) Larutan *creatine*;
- p) 1-*naphtol* yang dilarutkan dengan etanol;
- q) Larutan potasium hidroksida (KOH), 40%;
- r) *Tryptone* (atau *tryptophane*) *broth* (TB);
- s) Pereaksi Kovacs;
- t) *Semi-solid Nutrient Agar* (NA);
- u) *Salmonella monovalent* dan *polyvalent somatic* (O) *antiserum*;
- v) *Salmonella monovalent* dan *polyvalent flagellar* (H) *antiserum*; dan
- w) *Salmonella anti-Vi* sera.

#### A.6.3.4 Cara Kerja

##### A.6.3.4.1 Homogenisasi contoh dan pra-pengkayaan

- a) Timbang 25 g contoh ke dalam blender yang steril dan tambahkan 225 mL BPW steril. Kocok selama 2 menit;
- b) inkubasikan pada suhu  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $(18 \pm 2)$  jam.



**A.6.3.4.2 Pengkayaan**

- Pipet 0,1 mL biakan pra-pengkayaan ke dalam 10 mL media RVS dan 1 mL biakan pra-pengkayaan lainnya ke dalam 10 mL MKTTn *broth* dan vorteks masing-masing campuran tersebut; dan
- inkubasikan media RVS pada suhu  $(41,5 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 3)$  jam dalam penangas air bersirkulasi dan MKTTn *broth* pada  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 3)$  jam.

**A.6.3.4.3 Penanaman pada pembenihan pilihan/selektif**

- Kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum Ose diameter 3 mm, goreskan biakan pengkayaan MKTTn *broth* ke dalam cawan petri yang berisi media agar XLD, HE dan BS. Siapkan agar BS sehari sebelum digunakan dan simpan di tempat gelap pada suhu ruang sampai siap digores.
  - ulangi cara di atas dari media agar pengkayaan RVS;
  - inkubasikan cawan-cawan media agar BS, HE dan XLD selama  $(24 \pm 3)$  jam pada suhu  $37 ^\circ\text{C}$ ;
  - amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella* sp., setelah inkubasi  $(24 \pm 3)$  jam. Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella* sp. dari masing-masing media agar selektif setelah inkubasi  $(24 \pm 3)$  jam. Morfologi koloni mempunyai ciri-ciri sebagai berikut:
    - XLD : koloni berwarna merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam.  
Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam;
    - HE : koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam.  
Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.
    - BS : koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam.  
Jika masa inkubasi bertambah maka warna media disekitar koloni mula-mula coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap disekitar media.
- jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media agar BS setelah inkubasi  $(24 \pm 3)$  jam, jangan mengambil koloni tapi inkubasi kembali media selama  $(24 \pm 3)$  jam. Jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media agar BS setelah inkubasi  $(48 \pm 2)$  jam, ambil 2 atau lebih koloni tersebut.

**A.6.3.4.4 Uji Penegasan****A.6.3.4.4.1 Seleksi koloni untuk uji penegasan**

- Ambil sedikitnya 1 koloni tipikal pada masing-masing cawan yang berisi media XLD, HE, dan BS, ambil kembali sedikitnya 4 koloni bila koloni pertama tidak tipikal;
- goreskan masing-masing koloni tersebut pada agar miring yang berisi NA yang akan ditumbuhkan oleh koloni yang terisolasi dengan baik, kemudian inkubasikan pada suhu  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 3)$  jam;
- gunakan kultur murni untuk uji penegasan biokimia dan serologi selanjutnya.

**A.6.3.4.4.2 Uji penegasan biokimia**

- Dengan menggunakan jarum Ose berujung runcing steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dan inokulasikan ke dalam media TSI agar miring dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak;



b) inkubasi agar miring TSI pada suhu  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 3)$  jam. Pada TSI, perubahan yang terjadi pada medium adalah sebagai berikut:

- |                              |                                  |
|------------------------------|----------------------------------|
| - bagian tegak:              |                                  |
| kuning                       | glukosa positif                  |
| merah atau tak berubah warna | glukosa negatif                  |
| hitam                        | pembentukan $\text{H}_2\text{S}$ |
| gelembung atau retak         | pembentukan gas dari glukosa     |
| - permukaan agar miring:     |                                  |
| kuning                       | laktosa dan/atau sukrosa positif |
| merah atau tak berubah warna | laktosa dan sukrosa negatif      |

90% kasus tipikal *Salmonella* positif membentuk gelembung gas dan  $\text{H}_2\text{S}$  (warna hitam);

- c) dengan menggunakan jarum Ose berujung runcing steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dari A.7.3.4.4.1 dan inokulasikan ke dalam media Urea agar dengan cara menggores agar miring;
- d) inkubasikan agar miring urea pada suhu  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 3)$  jam, dan amati setiap interval waktu tertentu. Pada Urea agar, reaksi positif ditunjukkan dengan reaksi pemecahan urea yang menghasilkan ammonia akan menunjukkan perubahan warna *phenol red* menjadi merah mawar hingga merah muda dan kemudian akan semakin pekat. Reaksi akan muncul setelah 2 jam sampai dengan 4 jam;
- e) dengan menggunakan jarum Ose steril, inokulasikan koloni dari A.7.3.4.4.1 ke dalam media LDB, kemudian inkubasikan pada  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 3)$  jam, reaksi positif pada LDB ditandai dengan terbentuknya kekeruhan dan warna ungu setelah inkubasi. Warna kuning menunjukkan reaksi negatif;
- f) dengan menggunakan jarum Ose steril, inokulasikan koloni dari A.7.3.4.4.1 ke dalam tabung yang berisi 0,25 mL larutan *physiological saline* steril;
- g) tambahkan 1 tetes toluene dan kocok tabung. Tempatkan tabung pada penangas air bersuhu  $37 ^\circ\text{C}$  dan diamkan selama 5 menit, kemudian tambahkan sebanyak 0,25 mL pereaksi uji  $\beta$ -galaktosidase dan kocok hingga rata;
- h) inkubasikan tabung pada penangas air  $37 ^\circ\text{C}$  dan diamkan selama  $(24 \pm 3)$  jam, amati tabung pada interval waktu tertentu. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning. Reaksi muncul setelah 20 menit;
- i) dengan menggunakan jarum Ose steril, inokulasikan koloni dari A.7.3.4.4.1 ke dalam tabung steril yang berisi 3 mL media VP, kemudian inkubasikan pada suhu  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 3)$  jam;
- j) setelah inkubasi tambahkan dua tetes larutan *creatine*, tiga tetes larutan 1-*naphthol* yang dilarutkan dengan etanol, dan dua tetes larutan KOH 40%, kemudian kocok setelah penambahan tiap pereaksi tersebut. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah terang setelah 15 menit;
- k) dengan menggunakan jarum Ose steril, inokulasikan koloni dari A.7.3.4.4.1 ke dalam tabung steril yang berisi media TB, kemudian inkubasikan pada suhu  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 3)$  jam; dan
- l) setelah inkubasi tambahkan 1 mL pereaksi Kovacs. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya cincin yang berwarna merah, sedangkan pembentukan cincin berwarna kuning menunjukkan reaksi negatif.



#### A.6.3.4.4.3 Interpretasi hasil uji biokimia

Interpretasi hasil uji biokimia dapat dilihat pada Tabel A.3

**Tabel A.3 – Interpretasi hasil uji biokimia**

Uji biokimia	Galur <i>Salmonella</i>									
	<i>S. typhi</i>		<i>S. paratyphi</i> A		<i>S. paratyphi</i> B		<i>S. paratyphi</i> C		Galur lain	
	Reaksi	% <sup>a</sup>	Reaksi	% <sup>a</sup>	Reaksi	% <sup>b</sup>	Reaksi	% <sup>b</sup>	Reaksi	% <sup>a</sup>
TSI asam dari glukosa	+	100	+	100	+		+		+	100
TSI gas dari glukosa	- <sup>c</sup>	0	+	100	+		+		+	92
TSI asam dari laktosa	-	2	-	100	-		-		-	1
TSI asam dari sukrosa	-	0	-	0	-		-		-	1
TSI produksi H <sub>2</sub> S	+	97	-	10	+		+		+	92
Hidrolisis urea	-	0	-	0	-		-		-	1
<i>Lysine decarboxylation</i>	+	98	-	0	+		+		+	95
Reaksi $\beta$ -galactosidase	-	0	-	0	-		-		-	2 <sup>d</sup>
Reaksi Voges-Proskauer	-	0	-	0	-		-		-	0
Produksi indol	-	0	-	0	-		-		-	1
<b>CATATAN:</b>  <sup>a</sup> Persentase mengindikasikan bahwa tidak semua serotipe <i>Salmonella</i> menunjukkan reaksi yang ditunjukkan dengan + atau -. Persentase dapat bervariasi antar serotipe dan dalam serotipe dari <i>food poisoning serotype</i> dari lokasi yang berbeda  <sup>b</sup> Persentase tidak diketahui dari literatur  <sup>c</sup> <i>Salmonella Typhi</i> bersifat anaerogenik  <sup>d</sup> <i>Salmonella enterica</i> spp. <i>arizonae</i> memberikan reaksi laktosa positif atau negatif namun selalu menunjukkan reaksi positif pada $\beta$ -galactosidase.										



**A.6.3.4.4.4 Uji penegasan serologi dan serotyping**

Deteksi keberadaan antigen O-, Vi-, dan H- *Salmonella* diuji dengan aglutinasi (penggumpalan) dengan sera yang sesuai, dari kultur murni yang diperoleh dari A.7.3.4.4.1 dan setelah galur auto-aglutinasi dihilangkan.

**A.6.3.4.4.4.1 Penghilangan galur auto-aglutinasi**

- Tempatkan 1 tetes larutan *physiological saline* 0,85% pada gelas objek yang bersih;
- suspensikan sebanyak 1 Ose penuh biakan dari A.7.3.4.4.1 sampai terbentuk suspensi yang homogen dan keruh;
- goyangkan gelas objek selama 30 sampai dengan 60 detik dan amati gelas objek, bila bakteri mengelompok menjadi unit-unit terpisah maka galur tersebut termasuk auto-aglutinasi, dan tidak dilanjutkan untuk pengujian tahap selanjutnya.

**A.6.3.4.4.4.2 Uji antigen O-**

- Dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan Petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- gunakan koloni yang tidak termasuk galur auto-aglutinasi, tempatkan 1 tetes larutan *physiological saline* 0,85%;
- tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes antiserum O- ke dalam bagian yang lain;
- campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum Ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- klasifikasi uji *antiserum* O- menunjukkan hasil sebagai berikut:  
 Positif : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;  
 negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*; dan  
 non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *saline*.

**A.6.3.4.4.4.3 Uji antiserum Vi-**

- Dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan Petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- gunakan koloni yang tidak termasuk galur auto-aglutinasi, tempatkan 1 tetes larutan *physiological saline* 0,85%;
- tambahkan 1 tetes suspensi biakan di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil;
- tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes antiserum Vi- ke dalam bagian yang lain;
- campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum Ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- klasifikasi uji *antiserum* Vi- menunjukkan hasil sebagai berikut:  
 Positif : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;  
 negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*; dan  
 non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *saline*.



**A.6.3.4.4.4 Uji antigen H-**

- Inokulasikan media NA semi solid dengan koloni murni yang bukan merupakan galur auto-aglutinasi;
- inkubasikan media pada suhu  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  selama  $(24 \pm 3)$  jam;
- dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan Petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- emulsikan biakan pada NA semi solid setelah inkubasi dengan 2 mL 0,85% *saline* menggunakan jarum Ose;
- tambahkan 1 tetes suspensi biakan tersebut di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil;
- tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes antiserum H- ke dalam bagian yang lain;
- campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum Ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- klasifikasi uji *antiserum* H- menunjukkan hasil sebagai berikut:  
 Positif : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;  
 negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*; dan  
 non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *salin*.

**A.6.3.4.4.5 Interpretasi hasil uji penegasan**

Interpretasi hasil uji serologi yang merupakan uji penegasan dapat dilihat pada Tabel A.4.

**Tabel A.4 – Interpretasi hasil uji penegasan**

Reaksi biokimia	Auto-aglutinasi	Reaksi serologi	Interpretasi
Tipikal	Tidak	Antigen O-, Vi-, atau H-positif	Galur dipertimbangkan sebagai <i>Salmonella</i>
Tipikal	Tidak	Semua reaksi negatif	Kemungkinan adalah <i>Salmonella</i>
Tipikal	Ya	Tidak diuji	
Tidak tipikal	Tidak / Ya	Antigen O-, Vi-, atau H-positif	
Tidak tipikal	Tidak / Ya	Semua reaksi negatif	Bukan <i>Salmonella</i>

**A.6.3.4.1 Pernyataan Hasil**

Berdasarkan hasil interpretasi dapat menunjukkan keberadaan *Salmonella* pada contoh uji per 25 mL.



## Bibliografi

- Association of Official Analytical Chemist. 2005. *AOAC Official Method 932.12 Solids (Soluble) in Fruits and Fruit Products, Refractometer Method*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 37.1.15.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 942.15, Acidity (Titratable) of Fruit Products*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 37.1.37.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 971.21, Mercury in Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.2.22.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 985.61, Tin in Canned Food, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.2.35.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.1.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in foods: Absorption Spectrophotometry after Dry Ashing*, 18<sup>th</sup> Edition, Chapter 9.1.09.
- International Standard Organization. 2002. *ISO 6579: 2002, Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection of Salmonella spp.* 4<sup>th</sup> Edition.
- International Standards ISO 4833:2003 (E). *Microbial of Food and Animal Feeding Stuffs- Horizontal Method for The Enumeration of Microorganism – Colony Count Tehnique at 30 °C.*
- SNI 7387 : 2009. *Batas maksimum cemaran logam berat dalam pangan.*
- SNI 7388 : 2009. *Batas maksimum cemaran mikroba dalam pangan.*